

[5] リパーゼの高機能化を目指したエラーブローン PCR によるリパーゼ変異体の取得

末 信一郎、吉村英晃、黒田浩一、植田充美

1. 緒言

現在、アセテート繊維ではアルカリ減量加工が用いられているが、廃液の環境負荷の問題などから、環境にやさしい酵素などの生体触媒による減量加工法が模索されている。これまでに、我々は、エステラーゼの一種であるリパーゼによってアセテート繊維の脱アセチル化反応を行った後、セルラーゼにより加水分解する方法を検討してきた。しかし、既存のリパーゼは脱アセチル化活性が低いためリパーゼとセルラーゼを組み合わせた減量加工の実用性は低かった。そこで、脱アセチル化反応を効率よく行うため、エラーブローン PCR 法を用いて *Rhizopus oryzae*(クモノスカビ) 由来のリパーゼ(ROL)の遺伝子レベルでの改変を試みた。ROLをコードした ProROL 遺伝子配列中ヘランダムな変異を導入し、さらに細胞表面工学を用いることでハイスループットなスクリーニングを行い、セルロースアセテート(CA)に対する脱アセチル化活性のより高い変異体の取得を目指した。

2. 実験方法

Pro ROL 遺伝子を鋳型としてエラーブローン PCR を行うことでランダムに変異が導入されたインサート(断片)を得た。これを酵母細胞表面提示プラスミドである pWIFS のベクターをライゲーションすることで ROL 変異体表面提示プラスミドを構築し、変異体ライブラリーを取得した。

次に *p*-nitrophenyl acetate を基質とし

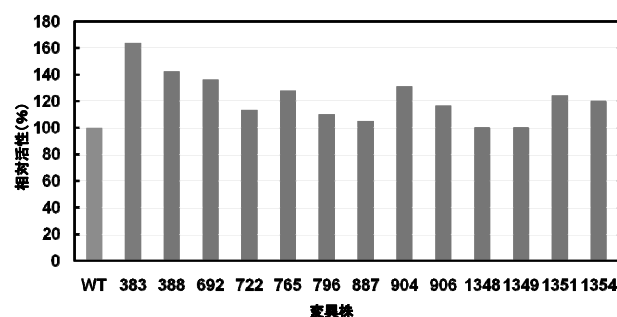


Fig. 1 各変異体の脱アセチル化活性

て用いた一次スクリーニングを行い、さらに基質として粉砕処理を施したセルローストリアセテートを用い、酵素反応で生じた遊離の酢酸を、HPLC にて検出することで二次スクリーニングを行った。

3. 結果と考察

得られた 1500 株の変異体の 1 次・2 次スクリーニングを行った結果、WT(野生型)よりも高い活性を示した変異体酵母 11 株を得た(Fig. 1)。中でも、No. 383 は WT に対して 1.7 倍と最も高い脱アセチル化活性を示した。この No.383 の変異部位の確認を行ったところ、2 ヶ所にアミノ酸残基の置換がみられた。そこで ROL と 99% の相同性をもつ RNL の三次元立体構造を基に pymol を用いて ROL の三次元構造を予測した。No.383 の変異導入部位は、ROL の触媒部位とは隔離されており、変異と機能向上との相関を論じるのは困難であった。次にクイックチェンジ法により K169I と V318A の変異をそれぞれ一つずつ WT へ導入し、どちらの変異が活性に影響を与えているのかを検討した。その結果、WT よりもすべての変異体において WT よりも高い活性がみられ、No. 383 は二つのアミノ酸変異による相補的な相加効果から脱アセチル化活性の上昇につながったと考えられた。今後は、得られた No. 383 をもとに二次エラーブローン PCR により脱アセチル化活性の高い変異体酵母の取得を目指していく。

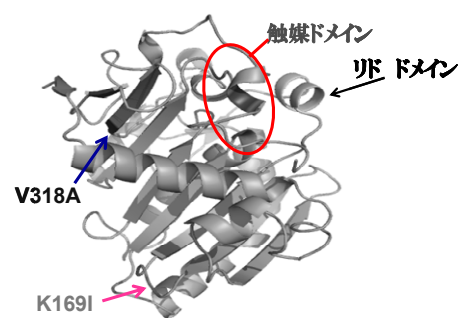


Fig. 2 ROL 変異体の変異導入点